

**Fluoreszenzangiographische und ophthalmoskopische
Studien bei heterologen Transplantationsversuchen
eines menschlichen Aderhautmelanoms im Tierversuch**

von

Klaus Michel

aus

Brünn



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Augenklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. E. Schreck

**Fluoreszenzangiographische und ophthalmoskopische
Studien bei heterologen Transplantationsversuchen
eines menschlichen Aderhautmelanoms im Tierversuch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Klaus Michel

aus

Brünn

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. G. Koch
Referent: Priv. Doz. Dr. E. Genße
Korreferent: Professor Dr. E. Schreck
Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1972

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	2
a) Kurze Übersicht über die Gewebezüchtung	2
b) Züchtung von Tumoren in vitro	6
c) Züchtung von Tumoren in vivo	8
d) Eigenschaftsänderungen von Tumorgewebe bei Züchtung in vitro und in vivo	10
e) Züchtung des menschlichen, malignen Chorioideamelanoms in vitro	12
III. EXPERIMENTELLER TEIL	14
a) Versuchsmaterial	14
1. Malignes Melanom der Aderhaut	14
2. Versuchstiere	18
b) Untersuchungsmethoden	19
1. Ophthalmoskopie	19
2. Fluoreszenzangiographie	20
c) Halterung	22
d) Versuchsablauf	26
1. Vorbehandlung der Versuchstiere	26
2. Übertragung von Melanomgewebe	26
3. Übertragung der Melanomkultur	27
4. Ophthalmoskopische Kontrollen	27
5. Fluoreszenzangiographische Kontrollen	29
e) Krankheitsverlauf	49
IV. DISKUSSION	51
V. ZUSAMMENFASSUNG	54
VI. LITERATURNACHWEIS	55

I. EINLEITUNG

Bei zahlreichen Versuchen wurden in Heterotransplantationen embryonales und Tumorgewebe in die vordere Augenkammer von Versuchstieren überimpft. Um das Verhalten von malignen Tumoren zu beobachten, fand diese Technik reiche Anwendung. Sie bietet den Vorteil, daß die Entwicklung von Tumorgewebe ständig und ohne Eingriff studiert werden kann. Allerdings sehen viele Pathologen diese Inoculationen nicht als heterologe Transplantation, sondern als Gewebezüchtung in einer "feuchten Kammer" an.

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, ein menschliches, malignes Aderhautmelanom in der Aderhaut von Kaninchen zu züchten. Dabei soll durch ophthalmoskopische und fluoreszenzangiographische Untersuchungen ein Einblick in das Wachstum und Verhalten des Tumors gewonnen werden.

II. LITERATUR

a) Kurze Übersicht über die Gewebezüchtung

LOEB (1897) war der erste, der Blutzellen, Bindegewebe und andere Gewebe als Explantate längere Zeit am Leben erhalten konnte. Als Nährboden verwandte er Serum und Plasma. Im Jahre 1907 bereits benutzte HARRISON die Methode der Explantation in vitro, um das anatomische Problem der Nervenentwicklung zu lösen. In der Folgezeit gewann die Gewebezüchtung zunehmende Bedeutung in der Bearbeitung cytologischer Probleme und fand in fast allen medizinischen Gebieten über Biochemie bis zur Strahlenkunde reiche Anwendung. Neuerdings konnte sie besondere Bedeutung gewinnen bei der Frischzellentherapie und für die Organtransplantation, wie Herz-, Nieren-, Leber- und Corneatransplantationen.

Die Gewebezüchtung, besser gesagt die Züchtung von Explantaten ist in der Lage, Zellen, Gewebe und ganze Organe in Kulturen zu halten. Sie wird dazu benutzt, in künstlichen Lebensräumen das Verhalten und die Reaktionen von Explantaten zu beobachten, die herausgelöst sind aus einem natürlichen korrelativen Verband eines Ganzen (BAUER 1954).

Bei der Züchtung bedient man sich der verschiedensten Methoden. Zwei der gebräuchlichsten seien hier genannt:

Die Deckglasmethode, die Züchtung im hängen Tropfen, zuerst von HARRISON (1907) benutzt, gestattet Wachstum über längere Zeit hin zu erhalten und zu beobachten. Als Nachteil wirken sich dabei ständige und häufige mechanische Eingriffe aus, die in kurzen zeitlichen Abständen an der Kultur notwendig sind. Da der Lebensraum sehr klein ist und giftige Stoffwechselprodukte entfernt und verbrauchte Nährstoffe ergänzt werden müssen, sind diese Eingriffe nötig.

Die Flaschentechnik in der Carrel-Flasche bietet gegenüber der Deckglasmethode große Vorteile. Die Flasche nimmt wesentlich mehr Nährmedium ($1-5 \text{ cm}^3$) auf und der Lebensraum ist groß genug, so daß ein Austausch des Nährmediums erst nach längeren Zeiträumen notwendig wird. Die Flaschen werden durch Gummistopfen verschlossen gehalten und schützen vor Infektionen.

Von größter Bedeutung erweist sich bei Gewebekulturen der Nährboden. Dabei lassen sich unterscheiden:

a) Die protektiven Medien

Sie sind frei von wachstumsfördernden Substanzen, d.h. sie stellen Flüssigkeiten dar, in denen Explantate über eine bestimmte Zeit zu leben vermögen, ohne Wachstum zu zeigen. In den protektiven Medien kommen also keine Reizmittel vor, die sich direkt an die Teilungsfähigkeit der Zellen wenden. W.H. LEWIS und M.R. LEWIS (1925) z.B. haben stickstofffreie Salzlösungen auf ihren protektiven Einfluß auf Kulturen untersucht. Hühnermesenchym und Endothelelemente überleben einige Tage in einer Kochsalzlösung (0,75-0,9 %). Als protektive Medien können auch Lockelösung, Ringer- und Tyrodelösung angesehen werden. Ebenso gehören Serum und Plasma

dazu, denn Epithelien und Körpergewebe proliferieren sehr wenig, wenn sie ausschließlich damit gezüchtet werden.

b) Wachstumsfördernde Substanzen

Nach CARREL (1922) sind Lymphozyten imstande, einige Substanzen des Serums und Plasmas zu verwerten. Sie können in solchen Medien lange gezüchtet werden, wobei sie Struktur und Eigenschaften beibehalten und weit in das Kulturmedium eindringen.

Nach FISCHER (1941), ASTRUP (1942), EHRENSVARD und OEHELENSCHLÄGER (1948) sind zwei Substanzgruppen für das normale Zellwachstum in vitro notwendig: Embryonin, ein Nukleoproteid aus dem Embryonalextrakt, und dialysable Substanzen aus dem Serum, welche eine Zelldegeneration in vitro verhindern. CARREL und BAKER (1925-1938) berichten in sehr ausgedehnten Arbeiten, daß wachstumsfördernde Substanzen in der Globulinfraction liegen. Andere Autoren schließlich weisen auf eine stimulierende Wirkung von Mucopolysacchariden hin. Auch Aminosäuren sollen diese Wirkung besitzen. Es scheint wichtig, darauf hinzuweisen, daß ein und derselbe Nährstoff für verschiedene Explantate sowohl protektiven Charakter als auch stimulierende Wirkung besitzen kann.

Erwähnenswert sind auch die Zellteilungsgifte, die von verschiedenen Autoren angegeben werden, z.B. Licht verschiedener Wellenlänge bei malignen Zellen, Röntgenstrahlen, Wärme usw., Steroide, wie Cortison, Desoxycorticosteron, Testosteron und Progesteron.

Künstliche Nährböden werden angegeben von CARREL und BAKER, FISCHER (1939) und ASTRUP (1939). Auch bei diesen Nährböden lassen sich wieder die zwei oben genannten Arten unterscheiden. Allerdings sind auch hier, wenn auch in geringem Maße Serum, d.h. Stoffe unbekannter Zusammensetzung enthalten. WHITE machte als erster 1946 Angaben über brauchbare vollsynthetische Nährlösungen genau bekannter Zusammensetzung.

Als weitere Faktoren, die bei den Gewebekulturen große Wichtigkeit erlangten, sind zu nennen: Temperaturen beim Ansetzen und Züchten, der pH-Wert des Nährmediums, die O_2 und CO_2 Spannung in vitro. Außerdem ist zu beachten, daß verschiedene Kulturen verschiedene Nährböden für ein optimales Wachstum erfordern.

Im Gegensatz zur Kultur in vitro wird bei der Züchtung von Gewebe in vivo das Explantat auf Lebewesen übertragen. Dabei lassen sich zwei verschiedene Übertragungsarten des Explantates unterscheiden. Die Heterotransplantation bietet die geringsten Chancen, daß das Explantat anwächst oder über längere Zeit am Leben erhalten werden kann, während Homotransplantate wesentlich bessere Voraussetzungen zum Überleben besitzen. Für alle beide Übertragungsarten spielt die Immunreaktion des Empfängers eine entscheidende Rolle. Sie wirkt sich bei der Heterotransplantation meist stärker aus, da das zugeführte Eiweiß vom Abwehrmechanismus des Empfängers schneller und eindeutiger als artfremd identifiziert und abgestossen wird. Die Immunabwehrreaktionen lassen sich mit Hilfe von Corticosteroiden für längere Zeit unterdrücken. Im Unterschied zur Gewebekultur in vitro wird die Kultur in vivo zahlreichen, unbekannten Einflüssen des Empfängerorganismus ausgesetzt, weshalb viele Erscheinungen und Er-

gebnisse bei Transplantationen nur schwer oder gar nicht zu deuten sind. In den meisten Fällen können die angelegten Kulturen erst nach dem Tode der Versuchstiere zu Untersuchungen herangezogen werden, während Kulturen in vitro gezüchtet, ständig zu Beobachtungen und Untersuchungen verfügbar sind.

b) Züchtung von Tumoren in vitro

Die Gewebe- oder Zellzüchtung, die Explantation von Tumorzellen ist das Gegenstück zur Transplantation von Tumorzellen. Bei der Gewebezüchtung werden aus dem krebserkrankten Organismus Tumorzellen explantiert, um ihr Verhalten ohne den Wirtsorganismus zu beobachten.

Die Züchtung von Geschwulstzellen menschlicher Tumoren gelang CARREL und BURROWS schon 1911. Inzwischen sind durch Verbesserungen in der Züchtungstechnik eine große Zahl von Tumoren durch Gewebezüchtung analysiert worden. Einen Hauptteil stellt dabei der HeLa-Zellstamm (eine Gewebekultur aus dem Cervix-Ca einer Frau), der im Unterschied zu anderen menschlichen Tumorarten sehr leicht zu züchten ist und sich seit 1951 in Kulturen weiter überimpfen ließ. Tumorzellen weisen gegenüber normalen Zellen in vitro Unterschiede auf. Sie sind schwieriger zu züchten, sind in der Lage, bei gemeinsamer Kultur mit gutartigen Zellen diese zu überwuchern und sind sehr viel empfindlicher gegen Änderungen ihrer Lebensbedingungen.

Maligne Tumoren zeigen in vitro gegenüber fibrinhaltigen Nährböden stark verflüssigende Eigenschaften. Das war auch anfangs die Schwierigkeit, betreffende Gewebe für längere Zeit zu züchten. Sehr früh nützte man die Fähigkeit der Tumorzellen in vivo, gesundes Gewebe zu infiltrieren aus und gab zu Sarkomgewebe in vitro totes Muskelgewebe. Dadurch wurde die Verflüssigung eingedämmt. Später wurden flüssige Medien und künstliche solide Phasen (Cellulose, Nylongewebe usw.) verwandt, was die Züchtung von Geschwulstgeweben sehr erleichterte.

GREENE und EHRLICH (1958) erzielten bei ihren Züchtungsversuchen von Uveamelanomen mit einer Nährlösung aus Hühnerplasma, verdünnt mit menschlichem Serum, ultrafiltriertem Rinderserum und einem Extrakt aus Hühnerembryonen gute Erfolge. Dabei verwandten sie die Methode der Tropfenkultur von MAXIMOW (1925), modifiziert von MURRAY und STOUT. Die Kulturen werden bei einer Temperatur von $36,5^{\circ}\text{C}$ gezüchtet, dreimal wöchentlich mit Hanks Lösung gewaschen und die Nährlösung erneuert. Die Tumoren konnten länger als ein Monat ohne Übertragung in neue Gefäße am Leben erhalten werden. Das Wachstum von 21 Tumoren war zufriedenstellend, 15 Tumore wuchsen mittelmäßig und drei zeigten kein Wachstum.

WEITZMANN züchtete menschliche Tumoren in CARRELflaschen in folgender Weise. Er setzte das Explantat in eine Grundschrift aus $0,3\text{ cm}^3$ Hühnerplasma, $0,6\text{ cm}^3$ Tyrodelösung und einem Tropfen Embryonalextrakt während des Gerinnens ein. Das Gewebestück wurde anschließend mit einer Deckschrift aus $0,15\text{ cm}^3$ Hühnerplasma, $0,3\text{ cm}^3$ Tyrodelösung und einem Tropfen Embryonalextrakt überzogen. Zu allen Kulturen kam als flüssige Phase ein Medium, das zu 33 % aus menschlichem Serum,

zu 65 % aus Tyrodelösung und zu 2 % aus einem Heparin-zusatz einer 0,1 %igen Heparinlösung bestand. Mit diesem Nährmedium erzielte der Autor gute Erfolge, aber für Dauerzüchtungen schienen diese Böden nicht geeignet zu sein. Denn älteres Tumorgewebe begann sich nach einiger Zeit in der Kultur zu verflüssigen.

c) Züchtung von Tumoren in vivo

Die Züchtung von Tumorgewebe in vivo bereitet häufig Schwierigkeiten, weil der Wirtsorganismus das Einbringen körperfremden Eiweißes immer mit einer Immunabwehrreaktion beantwortet und versucht, das Implanat abzustossen.

Bei der Übertragung von Geweben sind zwei Arten zu unterscheiden. Die Homotransplantation verspricht mehr Erfolg, da das Transplantat auf dieselbe Tierart übertragen wird. Die Heterotransplantation bedeutet Gewebetausch zwischen verschiedenen Tierarten. Hierbei treten die Abwehrreaktionen wesentlich intensiver in Erscheinung. Mit Hilfe von immunsuppressiven Substanzen, wie Corticosteroiden, ist es möglich, diese Reaktionen zu unterdrücken (TOWBIN 1957). Ein Anwachsen des Implantats kann durch vorherige Röntgenbestrahlung des Tieres oder durch das Entfernen des Thymus gefördert werden.

Innerhalb dieser Transplantationsmöglichkeiten muß man noch unterscheiden zwischen Übertragung eines Gewebestückes direkt von Versuchstier zu Versuchstier und der Transplantation einer Gewebekultur, die in vitro gezüchtet wurde und sozusagen eine "Vermittlerposition"

zwischen beiden Tieren einnimmt. Beide Methoden führen sehr leicht zu verschiedenen Ergebnissen, da einmal das Gewebeteil direkt, oder relativ unbeeinflusst auf einen neuen Wirtsorganismus übertragen wird, während bei der Zucht in vitro fremde Einflüsse zur Wirkung kommen, die die Eigenschaften des Gewebes beeinträchtigen. Andererseits besteht hier die Möglichkeit, das zu übertragende Gewebe allmählich auf die Gegebenheiten des neuen Wirtsorganismus einzustellen.

Bei heterologen Transplantationen werden meist nur embryonales und Krebsgewebe verwandt. REESE (1948) berichtet über Verpflanzungen von menschlichem Krebsgewebe in die vordere Augenkammer von Meerschweinchen. Nach zehn Tagen wird das Material histologisch untersucht, wobei ein Angehen des Tumors als ein Beweis für die Malignität herangezogen wird.

Bewährt hat sich die heterologe Transplantation von Geschwülsten auch intraperitoneal, intramuskulär, subcutan, in Backentaschen und ins Gehirn. Es werden also bevorzugt Gebiete verminderter Reaktionsfähigkeit aufgesucht, d.h. Bezirke geringer Vaskularisation. Einige Versuchstiere erweisen sich für solche Transplantationsexperimente besonders geeignet, wie der syrische Goldhamster (BURNS und FRAUNFELDER), Meerschweinchen (TOWBIN), Hunde (DEMICHOW), Mäuse (ALGIRE, LOUSTALOT, LEGALLAIS, ANDERSON; GREENE 1948, SCHILLING und SNELL 1948, EICHWALD 1948, GREENE 1950).

GREENE (1958) verwandte für heterologe Transplantation eines homolog gezüchteten Hamstermelanoms Meerschweinchen, Mäuse und Kaninchen. Gewebestücke des Melanoms wurden in das Gehirn und in den subcutanen Raum übertragen. Dabei stellte der Autor fest, daß die Transplantation auf Mäuse gut gelang, bei Meerschweinchen

nur frische Gewebestücke des Tumors angingen und Kaninchen alle Transplantate verwarfen.

d) Eigenschaftsänderungen von Tumorgeweben bei Züchtung in vitro und in vivo

Die am häufigsten beobachteten Eigenschaftsänderungen bei Tumorkulturen in vitro betreffen die äußere Gestalt und das Verhalten einzelner Tumorzellen. Pseudopodien z.B. lassen sich nicht nur an Geschwulstzellen, sondern auch an normalen Körperzellen in vitro erkennen. Bei besonderen Gegebenheiten des Untergrundes der Kulturen (z.B. Nylongewebe, Wolle oder Glasplatten mit eingeritzten Furchen bestimmter Größe) kommen die thigmotaxischen Fähigkeiten der Zellen besonders zur Geltung. Sie scheinen an den einzelnen Fäden oder in den Furchen entlangzukriechen und richten sich in deren Verlaufsrichtung aus. Dabei sind sie langgestreckt und viel schmaler als Zellen von Kontrollkulturen BAUER (1954), WILLMER (1965). Durch Änderungen der Zusammensetzung von Nährmedien lassen sich z.B. Lymphosarkomzellen beeinflussen. In Ca^{2+} angereicherten Medien treten sie in runder Form auf, wird der Ca^{2+} Gehalt jedoch reduziert, so wachsen sie nur noch spindelig. In beiden Fällen aber bleibt die Wachstumsrate gleich, OWENS (1957). Über Änderungen von Strukturen innerhalb der Tumorzellen läßt sich nur sehr wenig sagen. Am auffallendsten bei Geschwulstzellen in vitro ist die erhöhte Zahl der Vakuolen, die anscheinend der Nahrungsaufnahme dienen. Es ist aber nicht möglich, Zellen mit erhöhter Vakuolenzahl eindeutig als maligne Tumorzellen zu identifizieren (BAUER 1954). In einer Gewebekultur eines menschlichen Melanomsarkoms des Auges konnte

WEITZMANN bei neugebildeten Zellen eine ständige Abnahme des Pigmentgehaltes beobachten. In in vitro gezüchteten Kulturen war es bisher nicht möglich, maligne Tumorzellen wieder in das Gewebe ihrer Abstammung zurückzuverwandeln. Ähnliche Vorgänge können jedoch am Patienten beobachtet werden, wo sich maligne Tumoren mitunter spontan zurückbilden.

Eigenschaftsänderungen maligner Tumoren in vivo sind in der Literatur nur sehr selten angegeben. Das mag zum großen Teil daran liegen, daß das implantierte Gewebe erst durch Biopsie und Autopsie für Untersuchungen gewonnen werden muß, während Kulturen in vitro zu ständigen Beobachtungen verfügbar sind. Änderungen der äußeren Struktur von Tumorzellen in vivo, vergleichbar mit denen in vitro scheinen nicht vorzukommen. Wohl aber ist eine Änderung in der Stellung der einzelnen Tumorzellen zueinander durch Züchtungen in vivo möglich, wie GREENE 1958 in Transplantationsversuchen an syrischen Goldhamstern mit einem Melanom alveolären Musters zeigen konnte. Die alveoläre Struktur blieb durch die zweite Generation bestehen, war aber in der sechsten Generation nur noch gelegentlich anzutreffen. Meist stellte sich der Tumor als solide zelluläre Masse ohne definierbare Struktur dar. Der Autor bemerkte an einem Tier eine Variation des Pigmentgehaltes des Melanoms in der dritten Generation von pechschwarz in grau. Bei der Transplantation dieses Tumors ergab das Wachstum einer weißen Geschwulst, die sich vom Muttertumor nur in Hinsicht auf den Pigmentgehalt unterschied. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß er völlig amelanotisch war. Ähnliche Ergebnisse erzielte ALGIRE 1953 bei Transplantationsversuchen mit dem CLOUDMAN S 91 Melanom auf verschiedene Mäusestämme, wobei er jedoch albinotische Tiere verwandte. In seiner experimentellen Untersuchung war es GREENE 1958 möglich,

innerhalb des in vivo gezüchteten Melanoms weiße sarkomartige Strukturen festzustellen. Bei weiteren Übertragungen vom Melanom des alveolären Typs war es unter bestimmten Behandlungen der Versuchstiere möglich, Fibrosarkome zu erhalten. Dies gelang jedoch nur bei ca. 1/4 aller Tiere. Bei einem anderen Tier trat eine andere Art der Transformation auf, denn in diesem Falle war die Morphologie des transplantierten Melanoms unverändert, der sarkomatöse Wechsel aber war nur in den Metastasen anzutreffen. Ebenso beobachtete ALGIRE (1953) bei seinen Arbeiten mit dem CLOUDMAN S 91 Melanom in mehreren Tieren ein sarkomatöses Wachstum des Tumors. Abschließend läßt sich sagen, daß Tumorkulturen in vivo andere Eigenschaftsänderungen erwarten lassen, als in vitro. Denn die Summe aller Einwirkungen auf das Geschwulstgewebe ist in vivo wesentlich größer, vielgestaltiger und gleichzeitig evolutionärer als in Kulturen in vitro, die sich nur gegen eine unbelebte Umwelt zu behaupten haben.

e) Züchtung des menschlichen, malignen Aderhautmelanoms in vitro

Einem Patienten wurde das linke Auge, das ein Aderhautmelanom aufwies, enukleiert. Man eröffnete es und entnahm einen Teil des Tumors, der zur Züchtung einer Kultur diente. Das Melanom wurde mit einer kleinen Schere so weit wie möglich in einer Petrischale zerkleinert. In einem Zylinderglas versetzte man die Gewebstückchen mit 10 cm³ Nährlösung und pipettierte sie fünf Minuten lang gut durch. Der Inhalt wurde anschließend in acht Vierkantflaschen aufgeteilt und mit

20 cm³ Nährmedium aufgefüllt. Die Flaschen kamen in einen Brutschrank, dessen Temperatur auf +37°C gehalten wurde.

Es wurde eine Nährlösung, 1961 von WOLLENSAK angegeben, verwendet. Sie war folgendermaßen zusammengesetzt:

Earl's Salzlösung	80 ml
Rinderserum	20 ml
LAH-Lösung	10 ml
Glukose	0,5 g
Yeast	0,1 g

Fünf Tage nach dem Ansetzen der Kultur wurden die Gewebeteile und Zellen zweier Flaschen mit Versenlösung abgelöst und mit Ringerlösung gewaschen. Anschließend wurden 0,5 cm³ der Kulturaufschwemmung in je ein Auge dreier Kaninchen eingebracht.

Die Gewebekulturen in den restlichen sechs Flaschen wurden unter mehrmaligem Wechsel des verbrauchten Nährmediums weitergezüchtet. Die Kulturen konnten aber nicht länger als ein Monat am Leben erhalten werden.

Mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tumorzellen aus der Kultur zeigten, daß der Pigmentgehalt der Zellen im Laufe der Zeit abnahm und Mitochondrien in reichlicher Zahl auftraten. Außerdem hatten die Zellen nach einiger Zeit Pseudopodien ausgebildet und die Zahl der Vakuolen hatte sich vermehrt.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

a) Versuchsmaterial

1. Malignes Melanom der Aderhaut

Das Tumorgewebe stammte von einem 66jährigen Patienten, der mit folgender Anamnese in die Universitäts-Augenklinik Erlangen kam:

Zehn Tage vor der Einweisung habe er bemerkt, daß er bei Abdecken des rechten Auges links einen Gesichtsfeldausfall nach oben hatte und das Bild "vibrierte".

Zur Eigenanamnese gab der Patient an: Nach dem Kriege habe er eine Zeitlang Lungentuberculose gehabt, die nicht stationär behandelt worden sei. 1962 sei ein Magengeschwür operativ entfernt worden.

Als spezieller Befund ergab sich ein bräunlicher Tumor, der schon bei enger Pupille mit der Spaltlampe zu sehen war. Er wölbte sich von 4-10 h halbkugelig ins Augennere vor, zeigte an der Oberfläche teilweise weiße Streifen und verdeckte die Papille. Der Tumor engte den Kammerwinkel bei 7 h ein und bewirkte an dieser Stelle eine Abflachung der Vorderkammer. Die Iris wurde durch den Tumor von 5-8 h von der Wurzel her abgedrängt. Durch den Druck der Geschwulst von nasal unten hinten war die Linse nach oben temporal leicht verschoben.

Bei der Enukleation zeigte sich am Bulbus gegen 5 h retroäquatorial eine etwa 3 mm große suspekte Stelle, an der feine Kapillaren zu sehen waren. An dieser Stelle war der Tumor mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Sklera gebrochen. Deswegen wurde eine Röntgennachbestrah-

lung mit 16 Einzelsitzungen und ca. 4 000 R abgeschlossen.

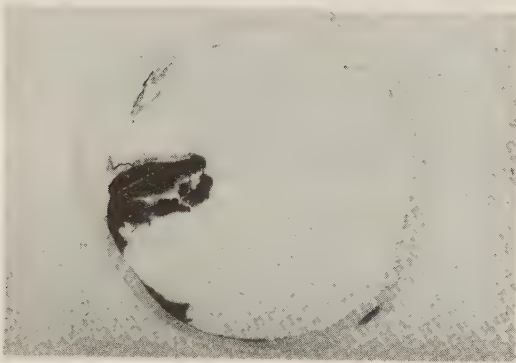


Abb. 1: Übersichtsaufnahme des histologischen Präparates des Melanoms bei ca 3,5-facher Vergrößerung

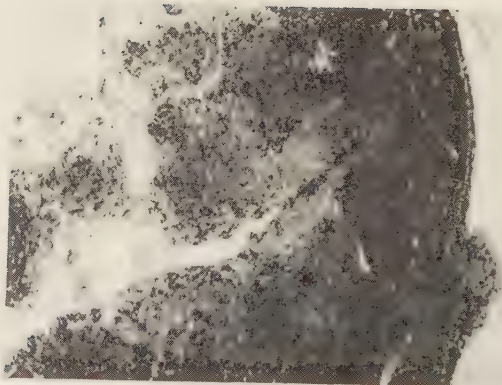


Abb. 2: Teilansicht des pigmentreichen Aderhautmelanoms bei 8-facher Vergrößerung

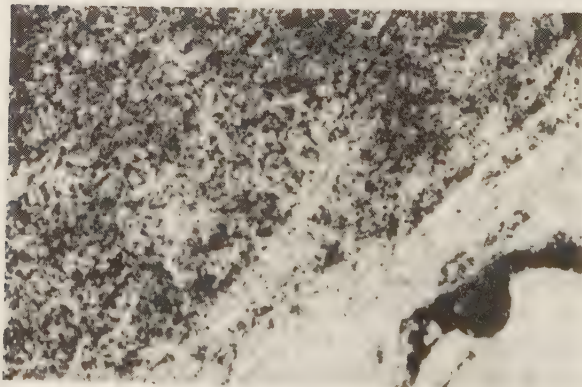


Abb. 3 a: Ausschnitt des Melanoms bei ca 200-facher Vergrößerung

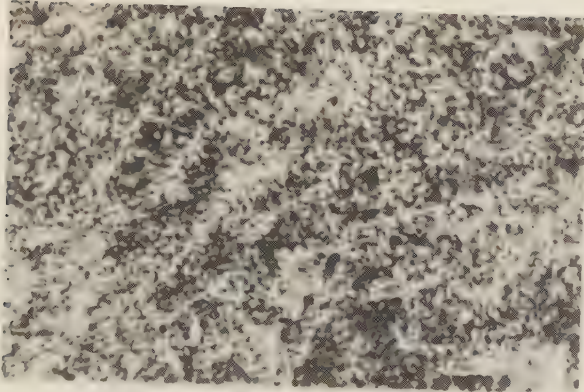


Abb. 3 b

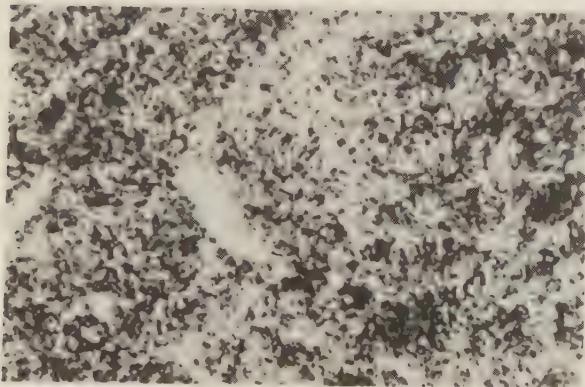


Abb. 3 c

Abb. 3 b und c: Hier sind die pigmentreichen Melanomzellen vom epitheloidzelligen Typ besonders gut zu erkennen. Vergrößerung ca. 500-fach

Bei dem Tumor handelt es sich um ein histologisch gesichertes, pigmentreiches, malignes Melanom der Aderhaut vom epitheloidzelligen Typ.

2. Versuchstiere

In den Versuchen wurden sechs gesunde Kaninchen im Alter von ein bis zwei Jahren verwendet. Ihr Gewicht lag zu Beginn des Experiments zwischen 1,65 und 2,70 kg. Besondere Beachtung wurde bei der Auswahl der Tiere dem Augenhintergrund geschenkt. Albinotische Tiere konnten in die Versuche nicht aufgenommen werden, da deren pigmentloser Augenhintergrund ein exaktes Fluoreszenzangiogramm nicht gestattete. Die natürliche Fluoreszenz und der grelle Augenhintergrund bewirkten bei Leeraufnahmen im Fluoreszenzangiogramm schon eine sehr starke Belichtung der photographischen Bilder. Befand sich aber Farbstoff in den Gefäßen des Augenhintergrundes, so trat in den photographischen Aufnahmen eine starke Überbelichtung auf, die eine genauere Auswertung des Fluoreszenzangiogramms unmöglich machte.

Tiere mit zu stark pigmentiertem Augenhintergrund erschienen für das Experiment deswegen ungeeignet, weil die starken Pigmenteinlagerungen für ein frühzeitiges Erkennen des melanotischen Prozesses hinderlich schienen. Deshalb wurden Tiere ausgewählt, deren Augenhintergrund gerade so stark pigmentiert war, daß die Fluoreszenz der Aderhautgefäße im Fluoreszenzangiogramm nicht als störender Nebeneffekt auftrat. Andererseits sollte der Augenhintergrund möglichst wenig pigmentiert sein, so daß der melanotische Prozeß frühzeitig zu lokalisieren war.

Das Experiment war in zwei Versuchsreihen zu je drei Tieren eingeteilt. Bei der einen Gruppe wurde ein Gewebestück implantiert, während bei der anderen eine Gewebekultur von Tumorzellen durch die Sklera in den Glaskörper eingebracht wurde.

b) Untersuchungsmethoden

1. Ophthalmoskopie

Die Verlaufskontrollen führten wir zum einen mit der Ophthalmoskopie im umgekehrten Bild durch. Sie erfordert wesentlich weniger Zeit und noch weniger technischen Aufwand als die Fluoreszenzangiographie. Dafür liefert die Fluoreszenzangiographie ein Abbild des funktionellen Zustandes des Augenhintergrundes, während die Ophthalmoskopie nur ein Bild des strukturellen Zustandes geben kann.

Vor Beginn der Untersuchung müssen die Tiere ebenso wie bei der Fluoreszenzangiographie vorbehandelt werden. Mit Hilfe von Mydriaticum Roche und 10 %igem Neosynephrine wird die Pupille des Tieres zu maximaler Öffnung gebracht.

Die Ophthalmoskopie im umgekehrten Bild hat den Vorteil, daß der Untersuchende den Augenhintergrund aus allen möglichen Richtungen betrachten kann, während bei der Fluoreszenzangiographie nur Inspektionen von frontal, nasal und temporal möglich sind. Von oben oder unten ließ sich bei den Tieren der Augenhintergrund gar nicht betrachten, da die Zeiss-Funduskamera nur um die vertikale Achse schwenkbar ist. Die fehlende Beweglichkeit der Kamera kann am Patienten leicht durch Bewegungen des Auges nach oben oder unten ausgeglichen werden. Bei Versuchstieren läßt sich die fehlende Beweglichkeit der Apparatur nur durch Drehung des ganzen Tieres oder dessen Kopfes erzielen. Deshalb war für die fluoreszenzangiographischen Untersuchungen die Anfertigung eines Gerätes unbedingt nötig, mit dem sich die Stellung des Kopfes und damit des Auges regulieren ließ.

2. Fluoreszenzangiographie

Zum anderen verwendeten wir für die Verlaufskontrollen die Fluoreszenzangiographie, um das Färbemuster eines im Anwachsen und in der Entwicklung begriffenen Melanoms zu beobachten.

Sie läuft in folgender Weise ab. Dem Versuchstier injiziert man $0,5 \text{ cm}^3$ einer 10 %igen Fluorescein-Natrium-Lösung in die Ohrvene. Dieser Farbstoff lagert sich an den Albuminen und der Oberfläche der Erythrozyten an und gelangt mit dem Blutstrom durch die Arteria ophthalmica in die Gefäße des Auges. Beim Durchfluß des Fluoresceins durch die Gefäße des Augenhintergrundes unterscheiden NOVOTNY und ALVIS drei Phasen, eine arterielle, eine arteriovenöse und eine venöse Phase. Die Wände der Netzhautgefäße bestehen aus einem festen Verband von Endothel und einer äußeren Schicht von Gliazellen, durch die der Farbstoff nicht diffundieren kann. Deshalb bleibt die Netzhaut auch frei von Fluorescein. Die Auskleidung der Aderhautgefäße aber bildet ein weitporiger Verband von Endothelzellen, die der Farbstoff leicht durchdringen kann und sich in das umgebende Aderhautstroma einlagert. Die Bruchsche Membran und die Pigmentschicht verhindern jedoch die Anfärbung der darüber liegenden Netzhaut. Das starke Leuchten des angefärbten Aderhautstromas dämpft die Pigmentschicht je nach Stärke der Melanineinlagerungen zu einer mehr oder weniger starken, diffusen Untergrundfluoreszenz ab.

In der arteriellen Phase schießt der Farbstoff in die Arterien ein, in der arteriovenösen befindet er sich in dem Gebiet von Arteriolen und Venolen, während in

der venösen Phase die Venen zur stärksten Anfärbung kommen. Nach Abklingen der venösen Phase tritt die diffuse Untergrundfluoreszenz immer stärker hervor und bestimmt nun das Bild.

Der oben beschriebene Vorgang wird mit einer Zeiss-Funduskamera photographiert. Zu Beginn erfolgen meist einige Aufnahmen ohne Farbstoff, bis schließlich die verschiedenen Phasen in ihrer Reihenfolge aufgenommen werden.

Die Kamera besitzt eine 3,5-fache Realvergrößerung, ein Objektiv mit 1,5-facher Vergrößerung und einen Bildausschnitt in der Größe von 20° in der Diagonalen.

Das Licht, das den Fundus ausleuchtet, muß einen Erregerfilter passieren, der langwelliges Licht absorbiert und kurzwelliges Licht hindurchläßt. Das Fluorescein im Augenhintergrund transformiert sozusagen das auftreffende, kurzwellige Licht in langwelliges, welches reflektiert wird. Bevor es den Film belichten kann, führt sein Weg durch einen Sperrfilter, der kurzwellige Strahlen absorbiert und langwelliges ungehindert durchläßt.

Die halbautomatische Kamera wird über einen Fußauslöser bedient. Bei seiner Betätigung wird ein Impulsgeber angeregt, der über den vollautomatischen Robot-Motorrecorder für Belichtung und Weitertransport des Filmes sowie für die entsprechende Beleuchtung des aufzunehmenden Bildes durch Blitzlicht sorgt. Die kürzeste Aufnahmefolge beträgt 1,5 Sekunden. In jede Aufnahme wird ein kleines Amaturenbrett eingeblendet, welches mit einer Uhr, einem Bildzählwerk und einem Beschriftungsfeld ausgerüstet ist.

Während der Durchführung der Fluoreszenzangiographie muß der Versuchsraum völlig abgedunkelt sein, da sich das Tageslicht in den photographischen Aufnahmen durch Lichtreflexe störend bemerkbar macht.

c) Halterung

Die Halteapparatur für die Versuchstiere diene gleichzeitig dazu, die fehlende Beweglichkeit der Kamera, die um die Horizontale nicht und die Vertikale nur beschränkt schwenkbar ist, auszugleichen.

Die Haltefunktion der Apparatur wird von zwei Elementen erfüllt. Drei Riemen sorgen für Ruhigstellung des Körpers der Versuchstiere, während ein Gestänge den Kopf fixiert. Beide Elemente sind auf einem Brett so angebracht, daß die Kaninchen in natürlicher Liegestellung gehalten werden. Das Gestänge besteht aus einer Eisenstange E, die senkrecht in das Brett eingelassen ist. In Kopfhöhe des Tieres ist mittels einer Schraubzwinge S eine Messingstange M angebracht. Sie kommt dem Versuchstier von vorne entgegen und ist so gebogen, daß sie über Nasenrücken, Stirn und Hirnschädel ziehend ständig am Kopf anliegt. In der Nackengegend teilt sich die Stange hufeisenförmig auf und umschließt teilweise den Hals des Kaninchens derart, daß der Kopf nicht nach unten durchgezogen werden kann.

Die Beweglichkeit ist nun soweit dadurch eingeschränkt, daß ein Ring R, der die Schnauze des Tieres umfaßt und an der Messingstange festgeschraubt wird, den Kopf fast völlig fixiert (Abb. 4).



Abb. 4: Halteapparatur in Ausgangsstellung, mit drei Riemen und der Eisenstange E. Daran ist durch eine Schraubzwinge S die Messingstange M befestigt. Die Messingstange dient dem Ring R als Führung und kann an ihr in beliebiger Entfernung von der hufeisenförmigen Gabelung festgeschraubt werden.

Knapp unterhalb der Messingstange ist in die Eisenstange ein Gelenk G eingelassen, so daß bei Schwenkung des oberen Teiles eine Drehung des Kaninchenkopfes erfolgt (Abb. 5).

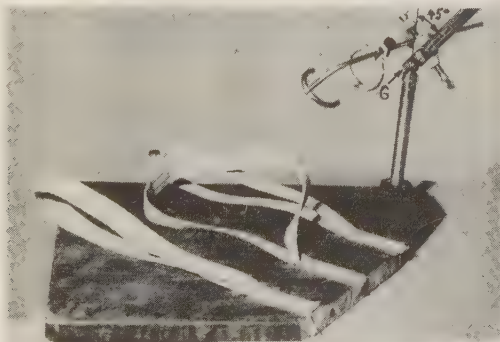


Abb. 5: Halteapparatur im Gelenk G um ca. 45° geschwenkt

Durch das Gelenk kann das Oberteil um die Sagittale bis zu max. 70° nach beiden Seiten geschwenkt werden, was einer Drehung des Kaninchenkopfes um die Sagittale gleichkommt (Abb. 6 a - 6 c).



Abb. 6 a:
Halteapparatur
mit fixiertem
Kaninchen in
Grundstellung



Abb. 6 b:
Kaninchen in der
Halteapparatur in
Schwenkstellung
um ca 60°



Abb. 6 c:
Halteapparatur
mit Kaninchen
von der Arbeits-
seite her be-
trachtet

Mit dem oben beschriebenen Gerät konnte die für diese Versuche völlig unzureichende Beweglichkeit der Kamera wenigstens teilweise ersetzt werden. Lagen die zu untersuchenden Bezirke des Augenhintergrundes jedoch sehr peripher, wurde nach Gaben von 10 %igem Novesin versucht, den Bulbus des Versuchstieres mit Hilfe von Pinzetten in die gewünschte Lage zu bringen. Da dies fehlschlug, war eine noch größere Drehung erforderlich, als dies durch das Gerät erzielt werden konnte. Das Versuchstier mußte auf die Seite gelegt und während der gesamten Untersuchung in ein und derselben Lage mit den Händen ruhig gehalten werden. Hierbei konnte aber nicht darauf verzichtet werden, den Bulbus mit der Pinzette den Untersuchungsgebieten entsprechend zu drehen. Dazu war schon erste und zweite Assistenz notwendig.

Bei dieser außerordentlichen Schräglage des Tieres war es sehr schwierig, den Bulbus in den richtigen Abstand zum Objektiv zu bekommen, da der Ramus mandibulae des Kaninchens vorher schon an den Vorderrand des Objekti-
tivs stieß. In derartiger Schräglage wirkte sich außerdem das Fell des Tieres sehr störend aus. Denn einzelne Haare richteten sich trotz Befeuchtung immer wieder auf und bewirkten starke Lichtreflexe im Fluoreszenzangiogramm.

Vor jedem Fluoreszenzangiogramm wurde das zu inspierende Auge luxiert, um dessen freie Beweglichkeit stark herabzusetzen. Durch ständiges Betropfen der Hornhaut mit physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Austrocknung derselben verhindert.

d) Versuchsablauf

1. Vorbehandlung der Versuchstiere

Vor Übertragung des Tumorgewebes erfolgte eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Corticosteroiden. Am dritten und ersten Tag vor der Transplantation erhielten die Kaninchen jeweils 25 mg Hostacortin H i.m. injiziert, da Heterotransplantata die stärksten Immunabwehrreaktionen auslösen.

2. Übertragung von Melanomgewebe

Vor Übertragung von Gewebestücken eines frischen, vom Patientenauge entnommenen Melanoms wurden die Versuchstiere mit der oben beschriebenen Halteapparatur fixiert. Nach Anästhesie mit 10 %igem Novesin luxierte man das rechte Auge. Anschließend erfolgte die Narkotisierung des Kaninchens mit Epontol, das unter ständiger Beobachtung der Atmung in die Ohrvene injiziert wurde.

Nach Eröffnung der Bindehaut des Bulbus legten wir die Sklera örtlich frei. Zwischen Musculus rectus superior und Musculus obliquus superior wurde möglichst weit äquatorial ein Schnitt von 2 bis 3 mm Länge in die Sklera gelegt, ohne dabei größere Gefäße zu verletzen. In den Schnitt gingen wir mit einem Zyklodialysespatel ein und schafften uns durch Hebeln zwischen Sklera und Aderhaut eine taschenartige Erweiterung. Die beiden Wundränder wurden in der Mitte vernäht und vor Verknötung des Fadens schob man ein ca. 1 bis 2 mm³ großes Gewebestück des Melanoms in die vorbereitete Erweiterung.

Nach Applikation von Leukomycinsalbe in den Bindehautsack wurde das Auge in seine natürliche Lage zurückgebracht. Das behandelte Kaninchen stand nach der Narkose noch 20 Minuten unter Beobachtung.

3. Übertragung der Melanomkultur

Auf eine zweite Gruppe von Kaninchen wurde eine Kultur desselben Melanoms übertragen. Die Operationstechnik war die gleiche wie bei der Transplantation des Gewebestückes. Die Kultur wurde in der Nährlösung schwimmend mit einer Recordspritze aufgezogen.

In die taschenförmige Erweiterung zwischen Sklera und Aderhaut ging man mit der Injektionsnadel ein, schob die Kanülenspitze noch drei bis vier Millimeter weit über das Ende der Gewebetasche hinaus. Dort wurde ein Depot von ca. 0,4 bis 0,5 cm³ mit Kulturaufschwemmung gesetzt und die Wunde wie oben beschrieben versorgt. Um eine Ausfilterung der einzelnen Tumorzellen durch eine zu enge Kanülenpassage zu verhindern, wurde eine Injektionsnadel der Größe 2 gewählt.

4. Ophthalmoskopische Kontrollen

Bei den ophthalmoskopischen Verlaufskontrollen wurden jeweils Lage und Form des Transplantats ermittelt und in einer Skizze festgehalten. Dabei zeigte sich, daß die implantierten Gewebstücke sehr peripher, zum Teil am Übergang zur Ora serata lagen. In diesem Bezirk war es schwierig, den Ort der Implantate zu bestimmen, da

hier Stellen verstärkter und verminderter Pigmentierung ständig wechseln und ein besonders unruhiges Bild des Augenhintergrundes bewirken. Es war nicht leicht, diese Gebiete auszuleuchten. Sie erforderten einen sehr flachen Einfallswinkel des Lichtes, unter dem die Pupille nur noch als schmales Oval erscheint. Unter diesem Blickwinkel war der Bildausschnitt des Augenhintergrundes sehr klein und Cilien und Fellhaare wirkten stark störend.

Bei den Kaninchen, denen die Gewebekultur eingespritzt worden war, ließen sich die Tumorzellen leichter auffinden. Die Stelle, an der sie lagen, war gekennzeichnet durch eine Zerstörung des Pigmentblattes, das anscheinend beim Einstich mit der Kanüle verletzt worden war. Der Defekt des Pigmentepithels ließ sich knapp über dem auslaufenden Ende des nasalen Markflügels lokalisieren.

In den ersten beiden Wochen wurden die Versuchstiere alle zwei Tage ophthalmoskopisch untersucht. Damit war die Lokalisation des Transplantats ausreichend gesichert und die ersten Fluoreszenzangiogramme konnten angefertigt werden. Um in der Folgezeit ein etwaiges Wachstum besser feststellen zu können, erfolgten ophthalmoskopische Inspektionen nur alle drei Wochen. Dieser Turnus wurde beibehalten bis zum Fluoreszenzangiogramm, das 7,5 Monate später die Versuchsreihen abschloß.

Die Ophthalmoskopie der Versuchstiere, denen die Tumorzellen eingespritzt worden waren, ergab folgenden Befund des rechten Auges:

Bei jedem Tier fand sich gegen 2 h über dem Ende des nasalen Markflügels im Pigmentblatt ein länglich ovaler bis runder, weißgelblicher Defekt. Dieser war

scharf begrenzt und wies am Rande braune bis schwärzliche Pigmentanhäufungen auf. Die Pigmentaggregation war nicht erhoben und änderte Form und Größe bis zum Ende des Experiments nicht. Bei einem Kaninchen fanden sich im Glaskörper vier dunkelbraune, sandkorngröße, versprengte Zellhaufen, die bis zum Versuchsende vorhanden waren.

Das transplantierte Gewebestück stellte sich am Augenhintergrund bei zwei Tieren als prominenter, dunkelgrauer bis -brauner Herd dar, der nahe der Ora serata bei 1 h lag. Seine Konturen waren unscharf und von einem granulierten Randsaum umgeben. Gegen Ende des Versuches schien es, als hätte der Herd an Größe zugenommen. Bei einem Kaninchen dieser Versuchsreihe zeigte sich im Niveau des Pigmentepithels gegen 2 h ein keulenartiger grauer Fleck. Sein Randsaum war von der Umgebung scharf abgegrenzt und wies schwarze, körnige Pigmenteinlagerungen auf. Bei den Verlaufskontrollen ließ sich kein Wachstum feststellen.

5. Fluoreszenzangiographische Kontrollen

Etwa zwei Wochen nach Übertragung des Gewebestückes bzw. -kultur wurde nach Lokalisation der Herde durch eingehende ophthalmoskopische Inspektionen bei jedem Versuchstier ein Fluoreszenzangiogramm angefertigt.

Bei allen Kaninchen, denen die Gewebekultur eingespritzt worden war, zeigt sich eine intensive Färbung des weißgelblichen Pigmentblattdefektes in der arteriellen Phase. Die Pigmentanhäufung, die den Pigmentblattdefekt umgibt, färbt sich ebenfalls in der arte-

riellen Phase in einem bestimmten Bezirk, in der Mitte unterhalb des Defektes an (Abb. 7 und 8).

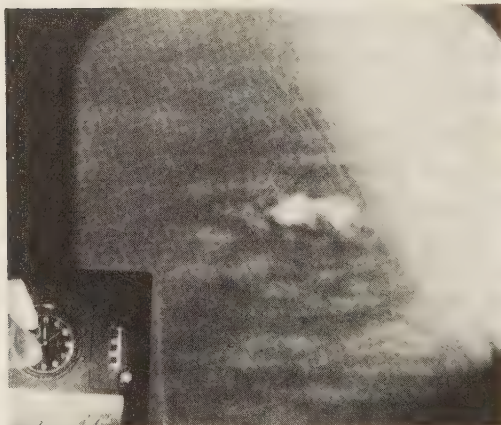


Abb. 7:

Leeraufnahme aus einem Fluoreszenzangiogramm des Kaninchens "Braun gespritzt", dem die Gewebekultur injiziert worden war. Die und die folgenden Aufnahmen stammen vom 30. Tag nach Übertragung der Kultur. Zu sehen ist der helle Pigmentblattdefekt, umgeben von feinen, unauffälligen Pigmentanhäufungen.



Abb. 8:

Aufnahme aus der arteriellen Phase. Die Gefäße sind farbstoffgefüllt. Der Defekt des Pigmentblattes und ein kleiner Teil P der Pigmentanhäufung unterhalb des Defektes zeigen eine intensive Färbung. Nun lassen sich die Pigmentanhäufungen auch gut erkennen.

Die arteriovenöse Phase weist zur arteriellen keine wesentlichen färberischen Unterschiede auf. Zu einer raschen Entfärbung des Pigmentblattdéfektes jedoch kommt es im Verlauf der venösen Phase, während der bereits in der arteriellen Phase angefärbte Abschnitt P der Pigmentanhäufung seine hohe Konzentration an Farbstoff weiterhin beibehält (Abb. 9).

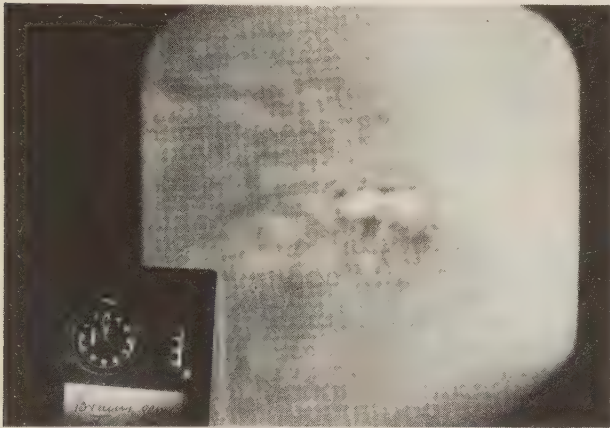


Abb. 9: Aufnahme aus der Mitte der venösen Phase. Die Entfärbung des Pigmentblattdéfektes ist schon weit fortgeschritten, die Farbstoffkonzentration in der Pigmentanhäufung P ist noch genauso stark wie in der arteriellen Phase.

In der auslaufenden venösen Phase entfärbt sich der Pigmentblattdéfekt völlig. Der Farbstoff dringt nicht über den Defekt in Retina oder Glaskörper ein. Von ihrer Umgebung hebt sich weiterhin die Pigmentanhäufung gut ab und ihr gefärbter Teil P verliert nur ganz allmählich den eingelagerten Farbstoff (Abb. 10 a, 10 b).



Abb. 10 a:
Die beiden folgenden Bilder, Abb. 10a u. b, von der auslaufenden venösen Phase veranschaulichen den ganz allmählichen Schwund von Fluorescein aus der Pigmentanhäufung P.

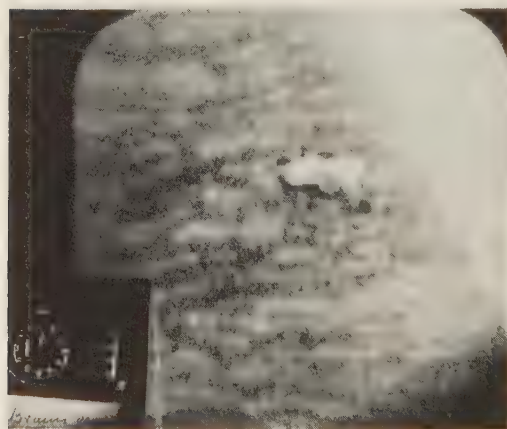


Abb. 10 b:
Auslaufende venöse Phase. Durch die diffuse Untergrundfluoreszenz heben sich die Pigmentanhäufungen um den Defekt besonders gut von ihrer Umgebung ab. Dieser Effekt ist während des gesamten Angiogramms zu beobachten, er nimmt jedoch zur Spätphase hin ab.

Während am Ende der venösen Phase der Pigmentblattdefekt völlig entfärbt ist, bleibt das Fluorescein bis weit in die spätvenöse Phase hinein im Teil P der Pigmentanhäufung liegen. Durch diffuse Untergrundfluoreszenz heben sich die

dunklen Pigmentanhäufungen am Rande des Defektes während des Fluoreszenzangiogrammes besonders gut von der Umgebung ab. Ein Eindringen des Farbstoffes über den Pigmentblattdefekt in die Retina oder den Glaskörper war dabei in keinem Fluoreszenzangiogramm festzustellen.

Bei einem zweiten Fluoreszenzangiogramm sechseinhalb Monate später war zu sehen, daß sich weder der Pigmentblattdefekt, noch die Pigmentanhäufung in Form und Lage zueinander wesentlich geändert hatten, noch zeigten sich Unterschiede im Färbemuster (Abb. 11 bis 14 c).

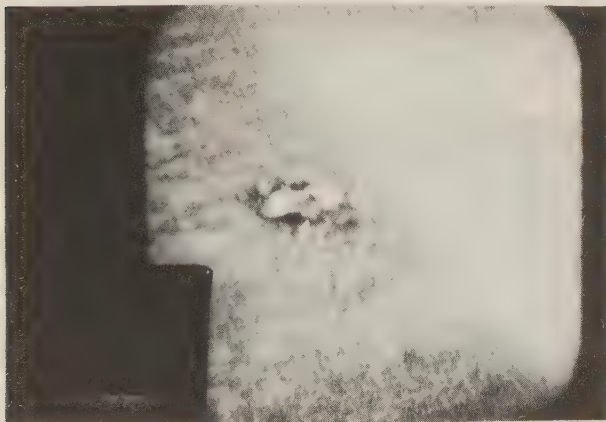


Abb. 11: Aufnahme aus dem zweiten Fluoreszenzangiogramm des Hasen "Braun gespritzt", sechseinhalb Monate später. Sie zeigt den Herd in der arteriellen Phase. Der Pigmentblattdefekt und Teil P der Pigmentanhäufung tritt nun optimal hervor. Es wurden hier $0,5 \text{ cm}^3$ Fluorescein injiziert.

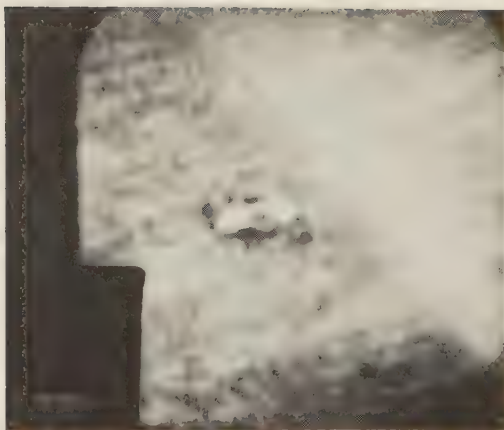


Abb. 12:
In der venösen Phase fällt auch hier wieder die rasche Entfärbung des Pigmentblattdefektes auf, während die Konzentration des Fluoresceins in der Pigmentanhäufung P noch genauso hoch ist, wie in der arteriellen Phase.

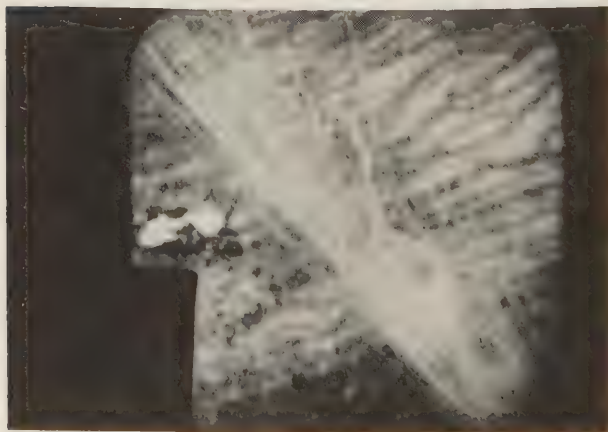


Abb. 13: Dieses Bild entstand etwa 6,5 bis 7,0 Minuten nach der Injektion des Farbstoffs. Die Gefäße sind nur noch sehr schwach gezeichnet. Die diffuse Untergrundfluoreszenz tritt immer stärker in den Vordergrund. Der Pigmentblattdefekt ist nun völlig entfärbt. Die Pigmentanhäufung P läßt noch eine hohe Fluoresceinkonzentration erkennen.

Abb. 14 a bis c zeigen den allmählichen Schwund der Fluoresceinkonzentration in der Pigmentanhäufung P und die immer fahler werdende Zeichnung der Netzhautgefäße.



Abb. 14 a:
Das Bild entstand ca. acht Minuten nach Injektion des Fluoresceins.

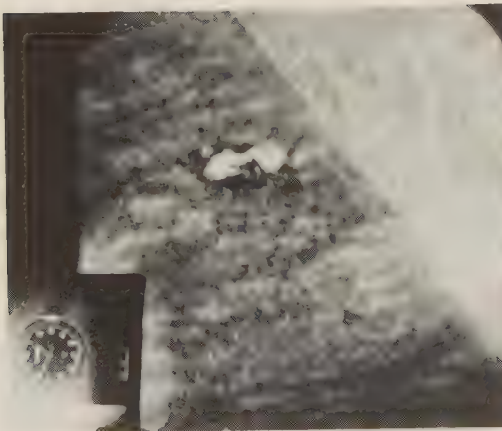


Abb. 14 b:
10 Minuten nach der Fluoresceinjektion.

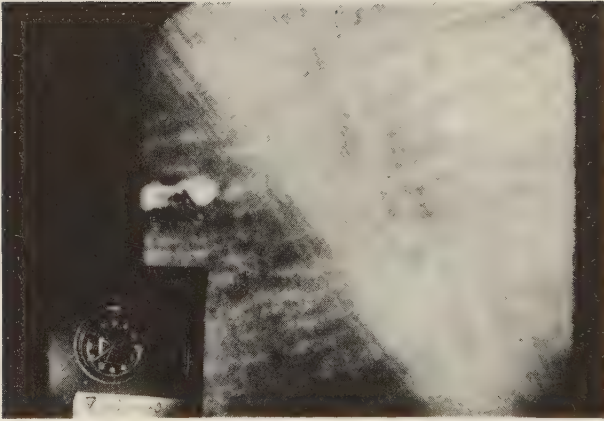


Abb. 14 c: 15 Minuten nach Injektion des Farbstoffes.

Die Gefäße der Netzhaut sind kaum noch zu erkennen. Die Entfärbung der Pigmentanhäufung P ist fast vollständig.

Da der Herd beim Hasen "Braun gespritzt" aus fotografischer Sicht sehr günstig lag, wurde zwei Wochen später noch ein drittes Fluoreszenzangiogramm angeschlossen. Die Aufnahmen dieser Serie zeichnen sich durch eine größere Bildqualität aus und lassen weitere kleine und kleinste Bezirke in den Pigmentanhäufungen erkennen, die sich ebenso verhalten wie der Bezirk P unter dem Pigmentblattdefekt (Abb. 15 bis 20).



Abb. 15: Leeraufnahme vom Hasen "Braun gespritzt" vor Injektion des Farbstoffs. Zu sehen ist der Pigmentblattdefekt, die Pigmentanhäufung ist unscheinbar.

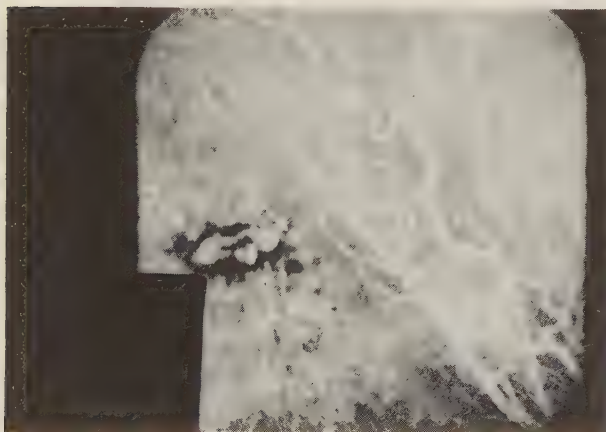


Abb. 16: Einflußphase. Die Anfärbung des Pigmentblattdefektes und der Bezirke P,A,B,C und D der Pigmentanhäufung erfolgt sofort mit dem Einstrom des Fluoresceins in die Netzhautarterien.

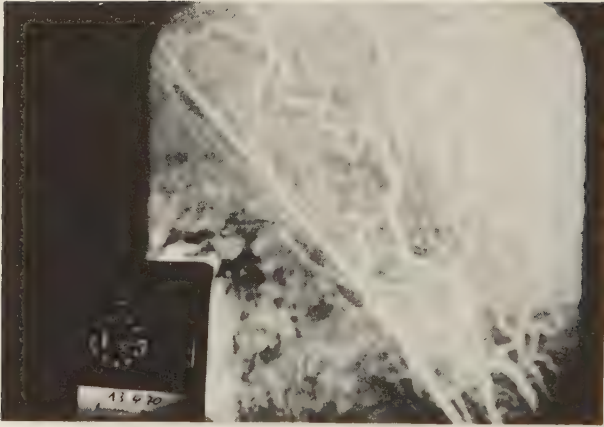


Abb. 17: 4 Sekunden später in der arteriovenösen Phase.
Die Färbung ist unverändert.



Abb. 18: Insgesamt 12 Sekunden später in der venösen
Phase. Beginnende Entfärbung des Pigment-
blattdefektes.

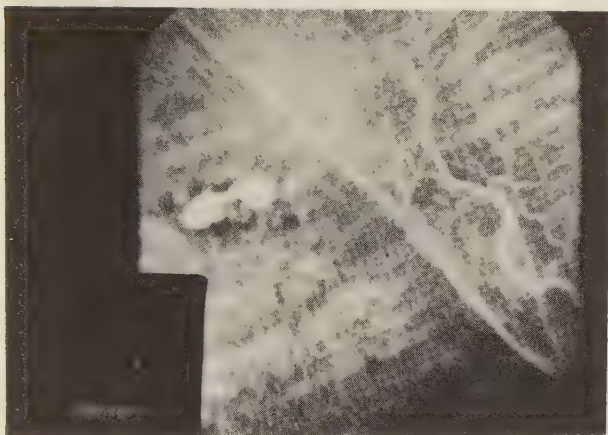


Abb. 19: Insgesamt 6 Minuten 50 Sekunden später. Der Pigmentdefekt ist fast völlig entfärbt. Der Verlust an Fluorescein in den Pigmentanhäufungen ist bereits erkennbar.

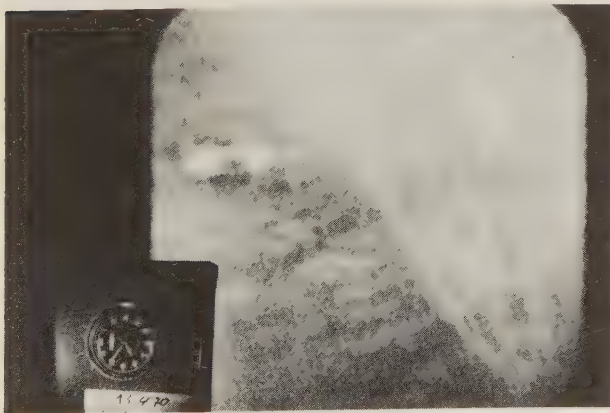


Abb. 20: Insgesamt ca. 19 Minuten später in der Spätphase. Der Ausgangszustand, vgl. mit Abb. 15, S. 37, ist wieder erreicht.

Bei den anderen beiden Kaninchen, "Schwarz-weiß gespritzt" und "Schwarz-braun gespritzt", zeigte sich ebenfalls ein Pigmentblattdefekt umgeben von Pigmentanhäufungen. Hier waren jedoch keine sich anfärbenden Pigmentanhäufungen zu erkennen. In färbemischer Hinsicht waren keine Unterschiede zwischen dem Pigmentblattdefekt vom Versuchstier "Braun gespritzt", "Schwarz-braun" und "Schwarz-weiß gespritzt" festzustellen (Abb. 21 bis 25).

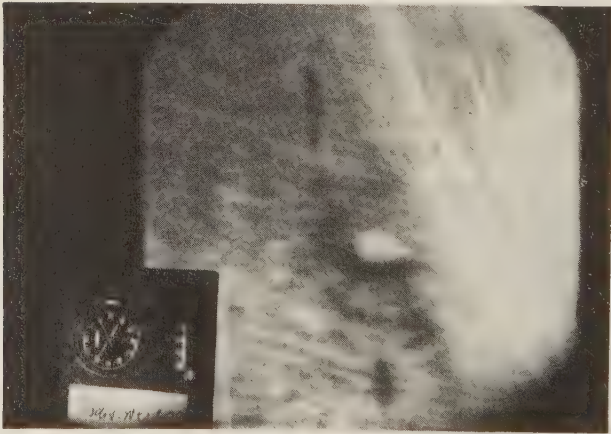


Abb. 21: Aus dem Fluoreszenzangiogramm von "Schwarz-weiß gespritzt". Anfärbung des Pigmentblattdefektes erfolgt mit dem Einstrom von Farbstoff in die Netzhautarterien.

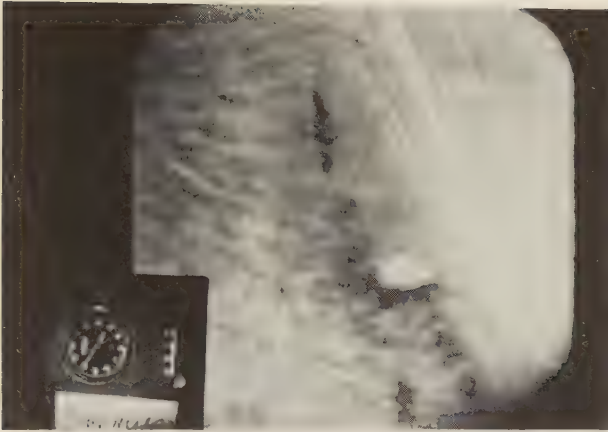


Abb. 22: 14 Sekunden später. Abnahme der Farbstoffkonzentration im Pigmentblattdefekt. Die Pigmentanhäufungen sind hier weiter gestreut, als beim Hasen (Braun gespritzt". Pigmentanhäufungen, die sich anfärben, kommen hier nicht vor.

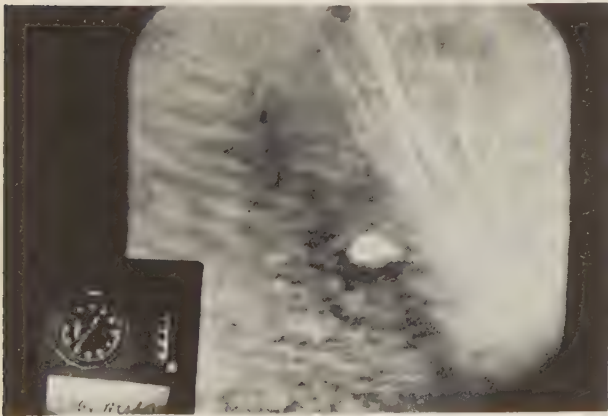


Abb. 23: Insgesamt 44 Sekunden später, in der venösen Phase. Die Entfärbung des Defektes ist beträchtlich vorangeschritten.

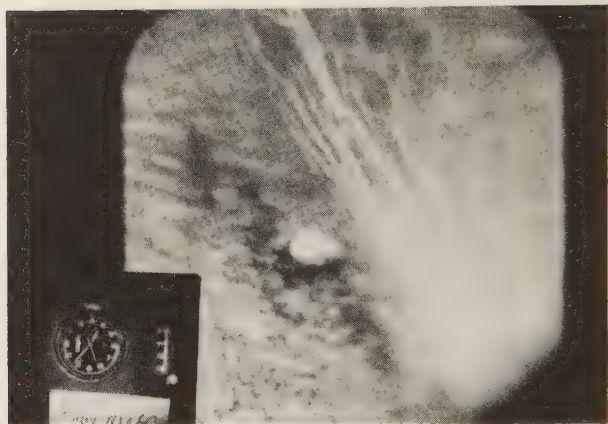


Abb. 24: Insgesamt 92 Sekunden später. Der Defekt hat sich völlig entfärbt, über ihn dringt kein Farbstoff in Retina oder Glaskörper.

Ein zweites Fluoreszenzangiogramm sieben Monate später erbrachte denselben Befund wie das erste Angiogramm. Pigmentanhäufung und Pigmentblattdefekt hatten weder Lage, noch Form geändert.

Bei den drei Versuchstieren mit dem implantierten Gewebstück konnte bei zwei Kaninchen eine Anfärbung der Herde im Fluoreszenzangiogramm festgestellt werden, der Herd des Hasen "Weiß-braun" jedoch blieb ungefärbt. Dieser Herd lag am Übergang zur Ora serata. Er war leicht prominent und wies unscharfe Konturen auf (Abb. 25). Das 2. Fluoreszenzangiogramm zeigte gegenüber dem 1. keine Änderungen.



Abb. 25: Aufnahme aus dem Fluoreszenzangiogramm des Hasen "Weiß-braun". Die Untergrundfluoreszenz läßt die Konturen der Pigmentanhäufung H etwas schärfer erscheinen, als sie im ophthalmoskopischen sind. Eine Anfärbung des Herdes in keiner Phase festzustellen.

Das Kaninchen "Schwarz" wies ebenfalls einen Herd am Übergang zur Ora serata auf. Bei Aufnahmen in diesem Gebiet traten sehr starke Verzerrungen auf, einmal bedingt durch den flachen Einfallwinkel des Lichtes zur Linse des Auges. Auf der anderen Seite wurden sie hervorgerufen durch die fehlende Bildschärfe, da die Tiefenschärfe der Kamera nicht ausreichte, um den Augenhintergrund in einer derartigen Schräglage exakt zu erfassen. In dieser extremen Situation traten häufig Lichtreflexe auf, die zum Teil ein Fotografieren unmöglich machten oder die aufgenommenen Bilder überstrahlten. Der Herd G des Hasen "Schwarz" war dunkelgrau pigmentiert, leicht erhaben und umgeben von einem unscharfen Saum. Im Fluoreszenzangiogramm zeigte sich an mehreren, stecknadelkopfgroßen Stellen eine Färbung. Da durch die periphere Lage kein Netzhautgefäß

im Bildausschnitt miterfaßt werden konnte, war die Phase, in der die Anfärbung des Herdes erfolgte, nicht eindeutig zu bestimmen. Vermutlich kam es in der arteriellen Phase zur Einlagerung des Farbstoffes, während die Entfärbung wahrscheinlich in der venösen und auslaufenden venösen Phase stattfand (Abb. 26 und 27).



Abb. 26:
Bild des Herdes G aus dem ersten Fluoreszenzangiogramm. Der unscharfe Saum ist nur schwer zu erkennen. Die stecknadelkopfgroßen Punkte geben etwa die Mitte des Herdes an.

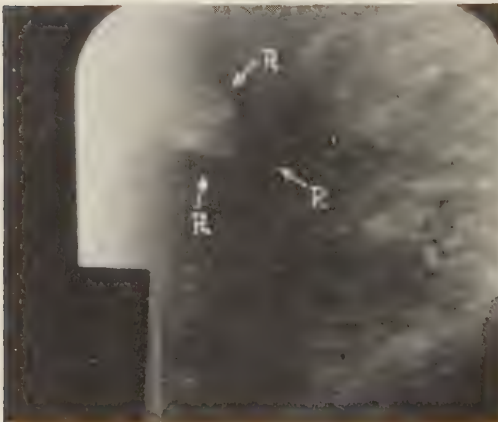


Abb. 27:
Etwa 30 Sekunden später. Die Färbung des Herdes ist bereits abgeschwächt. Der Randsaum R tritt hier ein wenig deutlicher hervor.

Das Färbemuster des Herdes G blieb beim Kaninchen "Schwarz" auch beim zweiten Fluoreszenzangiogramm sieben Monate später gleich.

Das Kaninchen "Weiß" hatte als ophthalmoskopischen Befund einen grauen, keulenartigen Fleck, der zum Teil von Pigmentierungen durchzogen war und eine kunkel pigmentierte Randzone aufwies. Auch in diesem Falle hatte das erste Fluoreszenzangiogramm keine Unterschiede zum zweiten Angiogramm sieben Monate später aufzuweisen. Deshalb soll hier nur das zweite Angiogramm als Beleg dienen (Abb. 28).

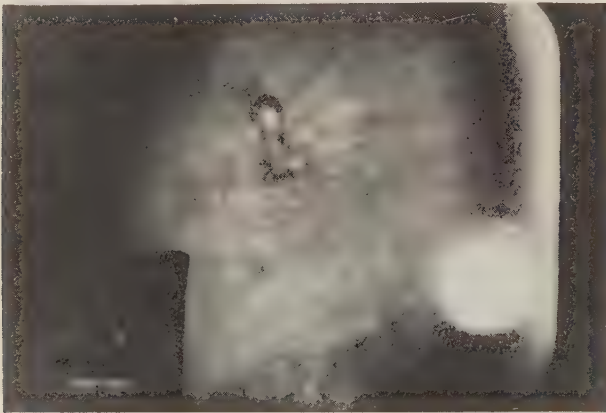


Abb. 28: Aus dem zweiten Angiogramm des Hasen "Weiß".

In der Leeraufnahme ist der dunkel pigmentierte Randsaum und das helle Innere, das von Pigmentierungen durchzogen wird, zu sehen.

Leider konnten auch hier die einzelnen Phasen des Fluoreszenzangiogramms, in denen Anfärbung und Entfärbung eintraten, nicht genau bestimmt werden. Eine Anfärbung des Herdes erfolgte vermutlich in der arteriellen Phase (Abb. 29).

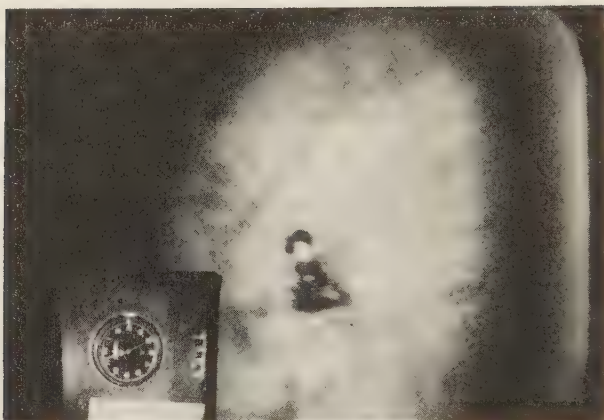


Abb. 29: Vermutliche arterielle Phase. Die vorher grauen Teile sind nun angefärbt.

In der arteriovenösen Phase hat die Farbstoffkonzentration im Herd ihren Höhepunkt erreicht (Abb. 30).

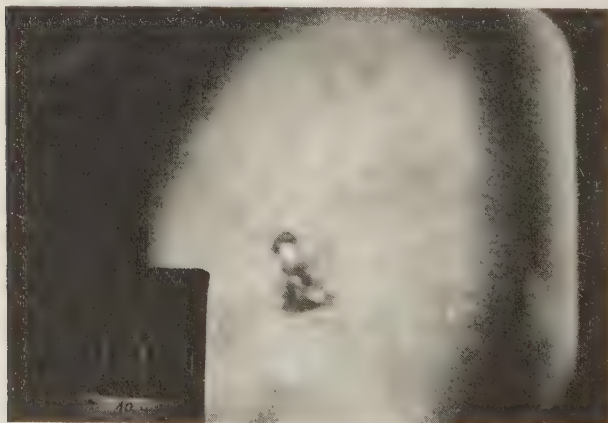


Abb. 30: Maximum der Konzentration des Fluoresceins in den angefärbten Bezirken.

Die folgenden Aufnahmen sind ausgezeichnet durch eine allmähliche Entfärbung des Herdes (Abb. 31, 32).

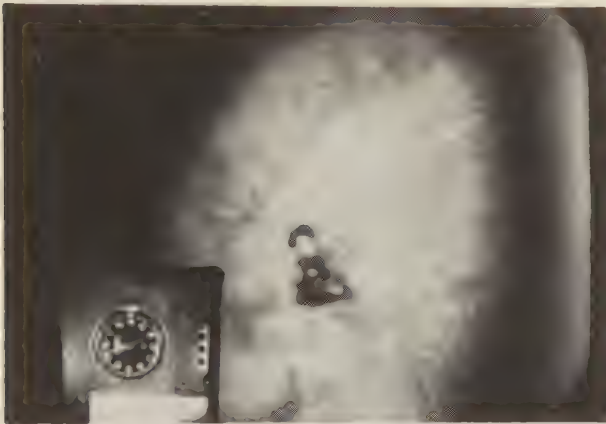


Abb. 31 : Schon in der beginnenden venösen Phase ist eine Entfärbung zu bemerken.

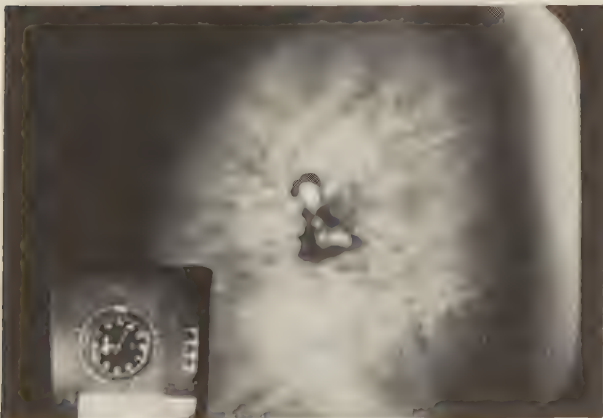


Abb. 32 In der vermutlichen venösen Phase hat sich die Konzentration des Fluoresceins weiter vermindert.

In der auslaufenden venösen Phase ist der Herd völlig entfärbt. Pigmentanhäufungen färben sich auch im weiteren Verlauf des Fluoreszenzangiogramms nicht an.

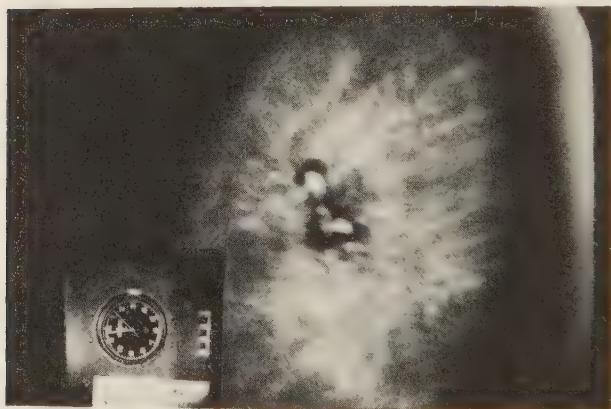


Abb. 33: Entfärbung in der auslaufenden venösen Phase.

Nachdem bei allen Fluoreszenzangiogrammen sieben Monate später die Färbemuster gleich blieben und sich eine eindeutige Aussage nicht machen ließ, ob die Herde Struktur und Größe nicht doch geändert hatten, sollten histologische Untersuchungen Aufschluß über die Entwicklung des Transplantates geben.

e) Krankheitsverlauf

Den operativen Eingriff überstanden alle Kaninchen gut. Zur Vermeidung einer Sekundärinfektion wurde die Wunde am Bulbus eine Woche lang mit Leucomycin-salbe behandelt. Danach war die Operationswunde narbig verheilt. Einer Transplantatsverwerfung vorzubeugen, führten wir eine Langzeitbehandlung mit Corticosteroiden durch. Ein rascher Wirkungseintritt wurde dadurch gesichert, daß man die Behandlung mit hohen Anfangsdosen von 25 mg Hostacortin H begann, die alle zwei Tage verabreicht wurden. Da jede langdauernde Corticoidtherapie zu reversibler Funktionseinschränkung der Nebennierenrinde führt, durfte die Cortisonbehandlung nicht abrupt unterbrochen werden, sondern mußte allmählich auslaufen. Deshalb wurde die Therapie nach zwei Monaten in ausschleichender Dosierung beendet, wobei 2 mg Hostacortin H alle drei Tage i.m. injiziert wurden.

Bei einem Hasen traten durch die Corticosteroidbehandlung Nebenwirkungen auf, wodurch es zu Gewichtszunahme kam. Eine lange Cortisonbehandlung bringt katabole Nebenwirkungen mit sich. Es gehen vor allem γ -G-Globuline verloren. Zur Therapie und Prophylaxe von Sekundärinfektionen wurde es notwendig, den Kaninchen gleichzeitig ein Breitspektrum-Antibioticum zu verabreichen. Mit den Corticosteroidgaben wurden Chemotherapeutica wie Leucomycin und Achromycin i.m. injiziert. Prophylaktisch erhielten die Versuchstiere nach jeder ophthalmoskopischen und fluoreszenzangiographischen Untersuchung Leucomycintropfen in das Auge.

Während der Hormontherapie unterlagen die Tiere ständiger Beobachtung und mußten besonders intensiv gepflegt werden. Trotzdem kam ein Versuchstier vor der zweiten fluoreszenzangiographischen Untersuchung durch eine Pneumonie ad exitum.

Nach siebeneinhalb Monaten wurden die Tiere getötet, die rechten Bulbi enucleiert und von jedem Kaninchen für die anschließenden histologischen Untersuchungen ein Stück von Leber und Lunge entnommen.

IV. DISKUSSION

Nach den heterologen Transplantationen von in vitro gezüchteten Kulturen eines menschlichen Melanoms der Aderhaut auf die Chorioidea von Kaninchen zeigte sich in allen drei Fällen ein Pigmentblattdefekt. Er war von mehr oder weniger stark ausgeprägten Pigmentanhäufungen umgeben, die teils diffus im angrenzenden Gewebe verliefen, teils scharf vom benachbarten Gewebe abgegrenzt waren. Innerhalb von 7,5 Monaten konnten keine Veränderungen des Bildes des Transplantationsherdes bei ophthalmoskopischen und fluoreszenzangiographischen Kontrollen festgestellt werden. Nur beim Kaninchen "Braun gespritzt" waren nach 7,5 Monaten noch weitere kleine Punkte neben dem anfänglich schon vorhanden gewesenen Bezirk P in der Pigmentanhäufung entstanden, welche sich im Fluoreszenzangiogramm bereits in der Einflußphase ebenso wie der Bezirk P intensiv färbten.

Das heterolog transplantierte Gewebestück stellte sich bei zwei Tieren als prominenter, dunkelgrauer bis -brauner Herd dar. Seine Konturen waren unscharf und von einem granulierten Randsaum umgeben. Bei einem Tier färbte sich im Fluoreszenzangiogramm an mehreren stecknadelkopfgroßen Stellen der Transplantationsherd an. Ein drittes Kaninchen wies am Ort der Transplantation im Niveau des Pigmentepithels einen grauen, keulenartigen Fleck auf, dessen Randsaum aus dunklen, körnigen Pigmenteinlagerungen von der Umgebung scharf abgegrenzt war. Bei allen drei Tieren dieser Versuchsreihe waren in den fluoreszenzangiographischen und ophthalmoskopischen Kontrollen innerhalb von 7,5 Monaten keine auffälligen Änderungen festzustellen.

Mit dieser Arbeit wird bestätigt, daß heterologe Transplantationen von in vitro gezüchteten Kulturen, sowie von Gewebestücken eines menschlichen Melanoms auf die Chorioidea von Kaninchen trotz Behandlung mit Cortison wenig Erfolg versprechen. In keinem Versuch konnte an Hand der ophthalmoskopischen und fluoreszenzangiographischen Befunde auf ein Angehen der Transplantate noch auf ein tumorartiges Wachstum geschlossen werden.

Vielmehr lassen sich die Pigmentdefekte als Zellnekrosen und die Pigmentanhäufungen am Rande der Defekte entweder als proliferiertes Narbengewebe mit Überproduktion an Pigment oder als von ungeschädigten, die Nekrose umgebenden Zellen gespeichertes Pigment aus den untergegangenen Zellen verstehen. Die Nekrosen dürften auf eine Verletzung durch die Kanüle, mit der die Kulturaufschwemmung eingebracht wurde, zurückzuführen sein oder aber auf eine traumatische Schädigung des Pigmentepithels mit dem Zyklodialysespatel. Nun erhebt sich die Frage nach dem Verbleib des eingebrachten Tumormaterials. Wahrscheinlich waren die Immunabwehrkräfte noch groß genug, um eine Transplantatverwerfung herbeizuführen. Die Aderhaut des Kaninchens erweist sich besonders für heterologe Transplantationen als äußerst ungünstig, da sie sehr gut vaskularisiert ist und die mit dem Transplantat eingebrachten Antigene rasch zu den regionalen Lymphknoten transportiert. Dort werden auf den Reiz hin immunologisch wirksame Lymphozyten gebildet, die eine Transplantatverwerfung herbeiführen. Für die erfolgreiche Durchführung in Experimenten, in denen heterologe Transplantationen durchgeführt werden sollen, scheint es sinnvoll, neben Gaben von immunsuppressiven Substanzen den Versuchstieren vor der Transplantation Thymus und Milz zu entfernen und bei beginnender Transplantatverwerfung eine

Röntgenbestrahlung durchzuführen. Dadurch können bereits gebildete und einwandernde, immunologisch aktive Lymphozyten zerstört werden. Vielleicht wäre es auch angebracht, zuerst eine heterologe Transplantation auf schlecht vaskularisiertes Gewebe von Kaninchen durchzuführen, um einen Tumor zu erhalten, der dann homolog leichter auf die Chorioidea zu übertragen ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde unter besonderer Beachtung der entsprechenden Literatur versucht, ein menschliches Aderhautmelanom auf die Aderhaut von Kaninchen heterolog zu transplantieren. Es sollten Entwicklung und Wachstum des Tumors ophthalmoskopisch und fluoreszenzangiographisch beobachtet werden. Dabei wurden zwei verschiedene Wege beschritten. Eine Gruppe von drei Kaninchen erhielt ein Gewebestück des Melanoms zwischen Sklera und Aderhaut implantiert, während drei andere Kaninchen eine Gewebekultur des menschlichen Aderhautmelanoms zwischen Sklera und Aderhaut eingespritzt bekamen. Um eine Transplantatverwerfung zu vermeiden, erhielten alle Tiere über längere Zeit hinweg Cortison und zum Schutz gegen Infektionen Antibiotika verabreicht. Ophthalmoskopische Kontrollen sicherten Lage, Größe und Form der Transplantate und fanden in regelmäßigen Abständen bis zum Ende der Versuche 7,5 Monate nach der Implantation statt. Kurz nach Beginn und kurz vor dem Ende der Versuche wurden von den Transplantationsherden aller Kaninchen Fluoreszenzangiogramme angefertigt. Anschließend histologische Untersuchungen bestätigten die fluoreszenzangiographischen Ergebnisse, die in allen sechs Fällen ein Aderhautmelanom oder einen Tumor der Aderhaut eindeutig ausschlossen.

VI. LITERATUR

- ALGIRE, G.H.,
LOUSTALOT, P.,
LEGALLAIS, F.Y. and
ANDERSON, B.F. : Growth and pathology of melanotic
and amelanotic derivatives of the
Cloudman Melanoma S. 91. Pig-
ment Cell Growth, Academic Press
Inc., Publishers. (1953)
- ATTARDI, G. and
MORO, F. : Caratteri morfologici degli ele-
menti dei melanomi della corioide
coltivati in vitro. Monit.zool.
ital. 62; 441 (1953)
- BARISHAK, R.Y.,
VANHERICK, W.,
YONEDA, C. : Tissue culture of uveal melanomas.
Arch. Ophthal. 64; 352 (1960)
- BARISHAK, R.Y. : Differential diagnosis of melanoma
cells in tissue cultures of uveal
melanomas. Arch.Ophthal. 64;
367 (1960)
- BAUER, K.F. : Methoden der Gewebezüchtung, S.
Hirzel Verlag Stuttgart 1954
- BAUER, K.H. : Das Krebsproblem, Springer-Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)
- BERNHARD, W. : Electron microscopy of tumor cells
and tumor viruses. Cancer Res. 18;
491 (1958)
- BURNS, R.P. and
FRAUNFELDER, F.T. : Experimental intraocular malignant
melanoma in the syrian golden ham-
ster. Amer.J.Ophthal. 51; 977(1961)
- BURROWS, M.T. : Studies on the nature of the growth
stimulus in cancer. J. Cancer Res.
10; 239 (1926)
- CARREL, A. : Artificial activation of the growth
in vitro of connective tissues.
J. exper. Med. 17; 14 (1913)
- CARREL, A. : A method for the physiological
study of tissues in vitro. J. ex-
per. Med. 38; 407 (1923)
- CARREL, A. and
M.T. BURROWS : Cultivation of adult tissues and
organs outside of the body. J.
Amer.med.Ass. 55; 1379 (1910)

- DAVIES, W.S. : Malignant melanomas of the choroid and ciliary body. A clinicopathologic study. Amer. J. Ophthal. 55; 541 (1963)
- DREW, A.H. : Notes on the cultivation of tumors in vitro. Arch.exper. Zellforsch. 5; 128 (1927)
- EARLE, W.R.,
SEE BRUES, A.M. : Tissue culture in the study of animal and human tumors. J. nat. Cancer Inst. 19; 771 (1957)
- FISCHER, A. : Dauerzüchtung reiner Stämme von Carcinomzellen in vitro. Z. Krebsforsch. 25; 112 (1927)
- FISCHER, A. : Züchtung von Carcinomgewebe in vitro. Arch. exp. Zellforsch. 6; 58 (1928)
- FORTNER, J.G. and
ALLEN, A.C. : Hitherto unreported malignant melanomas in the syrian hamster: An experimental counterpart of the human malignant melanomas. Cancer Res. 18; 98 (1958)
- FRANCOIS, J.,
M. HANSSENS : Histopathologie des melanomes maligns de la choroïde. Ophthalmologica 151; 135 (1966)
- FRANKS, L.M. : The growth of mouse prostate during culture in vitro in chemically defined and natural media, and after transplantation in vivo. Exp. Cell Res. 22; 56 (1961)
- GEY, G.O. : An improved technique for massive tissue culture. Amer. J. Cancer 17; 752 (1935)
- GOERTTLER, K. : Probleme und Möglichkeiten einer Gewebezüchtung in vivo statt in vitro. Anatom. Anzeiger 87; 22 (1939)
- GREENE, H.S.N. : Heterologous transplantation of mammalian tumors. I. The transfer of rabbit tumors to alien species. II. The transfer of human tumors to alien species. J. Exp. Med. 73; 461 (1941)
- GREENE, H.S.N. : The heterologous transplantation of human melanomas. Yale J. Biol. and Med. 22; 611 (1950)

- GREENE, H.S.N. : The transplantation of tumors to the brain of heterologous species. *Cancer Res.* 11; 529 (1951)
- GREENE, H.S.N. : A spontaneous melanoma in the hamster with a propensity for amelanotic alteration and sarcomatous transformation during transplantation. *Cancer Res.* 18; 422 (1958)
- GUERRA, R. and F. DIANZANI : Studies on tissue cultures of human melanoma of the choroid. *Ophthalmologica* 151; 705 (1966)
- HARRISON, R.G. : Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. exper. Biol. and Med.* 4; 140 (1907)
- LEWIS, M.R. and W.H. LEWIS : The growth of embryonic chick tissues in artificial media, agar and bouillon. *Bull. Hopkins Hosp.* 22; 126 (1911)
- LUND, O-E. und G. KERSTING : Über das Verhalten intraocularer Tumoren als Gewebekultur. *Ber. dtsh. ophthal. Ges.* 63. Zusammenkunft, Berlin 1960, 204 (1961)
- MAXIMOW, A. : Tissue cultures of young mammalian embryos, *Contr. Embryol. Carneg. Instn.* 16; 47 (1925)
- RAUBITSCHKE, H.V. : Die heterologe Transplantation maligner Tumoren in die vordere Augenkammer und ihre Beziehung zur Autonomie und Metastasenbildung. *Wien. klin. Wschr.* 65; 992 (1953)
- REESE, B.A. and G. EHRlich : The culture of uveal melanomas. *Amer. J. Ophthal.* 46; 163 (1958)
- SANFORD, K.K., G.D. LIKELY and W.R. EARLE : The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma-producing cells in vitro. *J. nat. Cancer Inst.* 15; 215 (1954)
- SCHILLING, J.A., A.C. SNELL jr. and B.V. FAVATA : Heterologous ocular transplantation as a partial test for cancer. *Cancer*, 2; 480 (1949)

- SHUBIK, P.,
G. DELLA PORTA,
H. RAPPAPORT and
K.A. SPENCER : A transplantable induced melanotic
tumor of the syrian golden ham-
ster. Cancer Res. 16; 1031
(1956)
- SKIFF, J.V.,
A.A. STEIN,
M. MAISEL,
C. HEILBRUNN and
D. HERTZ : Observations on the heterologous
transplantation of human tumors.
Cancer Res. 18;
: 485 (1958)
- SNELL, A.C., Jr. : Ocular and subcutaneous inflamma-
tory responses to transplantation
of heterologous tumors. Arch. of
Ophthal. 48; 298 (1952)
- SNYDER, W.B.,
L. ALLEN and
O. FRAZIER : Fluorescence angiography of ocular
tumor. Trans. Amer. Acad. Ophthal.
: Otolaryng. 71; 820 (1967)
- TOOLAN, H.W. : Growth of human tumors in cortisone-
treated laboratory animals: the
possibility of obtaining permanent-
ly transplantable human tumors.
Cancer Res. 13; 389 (1953)
- TOWBIN, A. : The heterologous transplantation
of human tumor. Cancer Res. 10;
716 (1951)
- TOWBIN, A. : A study of tumor tissue after trans-
plantation. Histologic changes ob-
served in anterior-chamber trans-
plants of heterologous tumor tissue.
A.M.A. Arch. 52; 199 (1951)
- TOWBIN, A. : Heterologous transplantation of ma-
lignant tumors to the anterior cham-
ber of the eye in guinea pigs trea-
ted with cortisone. Amer. J. Path.
33; 483 (1957)
- VOZZA, R. : Coltura in vitro di un melanosarcoma
della corioide con il metodo della
dispersione enzimatica delle cellule.
Boll. Oculist. 38; 629 (1959)
- VRABEC, F. : Les cultures intra-oculaires spon-
tanees des melanoblastomes de l'uvée.
Arch. Ophthal. 27; 159 (1967)
- WADDINGTON, C.H. : Experiments on the development of
chick and duck embryos cultivated
in vitro. Phil. Trans. 221; 179
(1932)

- WALLACE, A.C. : Transplantation of tumor tissue to the anterior chamber of the eye and to the brain. Canad. Cancer Conderence 1; 66 (1955)
- WEITZMANN, G. : Über die Züchtung einiger menschlicher maligner Tumoren in vitro. Zeitschr. f. Krebsforsch. 48; 1 (1938)
- WESSING, A. : Fluoreszenzangiographie der Retina. Lehrbuch und Atlas, Thieme Verlag Stuttgart 1968
- WHITE, P.R. : Prolonged survival of excised animal tissues in vitro in nutrients of known constitution. J. cell. camp. Physiol. 34; 221 (1949)
- WILLMER, E.N. : Morphological problems of cell type, shape and identification. Cells and tissues in culture. Methods, biology and physiology. Vol. 1, Chapter 4, Academic Press London-New York 1965
- WOLLENSAK, J. : Züchtung von Augentumoren in der Gewebekultur. Ber. dtsh. ophthal. Ges. 63. Zusammenkunft, Berlin 1960, 199 (1961)

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, Herrn Priv. Doz. Dr. E. Genée für die freundliche Überlassung des Themas, die stets bereitwillig gewährte Beratung, die Durchsicht des Manuskriptes und die Übernahme des Referates zu danken.

Herrn Prof. Dr. E. Schreck danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt außerdem Frl. Fuchs für die Entwicklung der Filme und die Anleitung bei den fluoreszenzangiographischen Aufnahmen, Frau Riebel für die Anfertigung der histologischen Präparate und Frl. Bendrich für Anleitung und Unterstützung bei der Züchtung der Gewebekultur.

Lebenslauf

Am 28. August 1943 wurde ich, Klaus Michel, als Sohn des Zahnarztes Dr. Friedrich Michel und dessen Ehefrau Ella Michel, geb. Röhling, in Brunn/CSSR geboren.

Im September 1949 trat ich in die damals zweiklassige Volksschule der Stadtrandsiedlung Erlangen ein. Ab der dritten Klasse besuchte ich die Prinz-Regenten Schule in Erlangen und bestand die Aufnahmeprüfung 1955 für die Ohm-Oberrealschule in Erlangen. An dieser Anstalt blieb ich bis Juli 1959 und besuchte von da an das Röntgen-Gymnasium in Würzburg, wo ich am 19. Juli 1966 meine Reifeprüfung ablegte.

Mein Studium begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, wo ich am 2. Mai 1969 das Physikum und im Dezember 1971 das zahnmedizinische Staatsexamen ablegte.

Seit 1. März 1972 arbeite ich als Assistent bei Herrn Dr. Bierschenk in Forchheim.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990